

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 9/34, 9/44 // (C12N 9/34, C12R 1:01)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 98/26058</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 18 juin 1998 (18.06.98)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/02271 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 11 décembre 1997 (11.12.97)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/15204 11 décembre 1996 (11.12.96) FR 97/02909 12 mars 1997 (12.03.97) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNES [FR/FR]; 9, boulevard de la Paix, F-51100 Reims (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> COPINET-LEGIN, Estelle [FR/FR]; 25, rue Ponsardin, F-51100 Reims (FR). DUCHIRON, Francis [FR/FR]; 4, allée J. Goujon, F-51100 Reims (FR). GANTELET, Hubert [FR/FR]; 3, rue Villain, F-08300 Sault les Rethel (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> HAMMOND, William; Cabinet Hammond, 33, rue Vaneau, F-75007 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> THERMOSTABLE ALPHA-GLUCOSIDASE ET PULLULANASE AND THEIR USES <b>(54) Titre:</b> ALPHA-GLUCOSIDASE ET PULLULANASE THERMOSTABLES ET LEURS UTILISATIONS <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a novel <math>\alpha</math>-glucosidase and a novel pullulanase obtained from a strain of the genus <i>Thermococcus</i> and the use for transforming a starch into a sugar syrup.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention est relative à une nouvelle <math>\alpha</math>-glucosidase et une nouvelle pullulanase obtenues à partir d'une souche du genre <i>Thermococcus</i> ainsi qu'à leur utilisation pour transformer un amidon en un sirop de sucre.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## ALPHA-GLUCOSIDASE ET PULLULANASE THERMOSTABLES ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention est relative à une nouvelle  $\alpha$ -glucosidase et une nouvelle pullulanase thermostables et à leurs utilisations industrielles.

Dans l'industrie de l'amidonnerie, la transformation de l'amidon en un sirop de glucose nécessite deux étapes enzymatiques. La première étape est actuellement réalisée par action d'une  $\alpha$ -amylase thermostable et la seconde par action d'une glucoamylase ou (d'une  $\alpha$ -glucosidase) et d'une pullulanase thermostables.

On connaît déjà des souches du genre *Thermococcus* permettant la production d'enzymes : par exemple le document WO-A-95/23852 concerne la souche *Thermococcus celer* capable de produire une amylase et une pullulanase.

Aussi un des buts de la présente invention est-il de fournir une  $\alpha$ -glucosidase qui agit dans les mêmes conditions que l' $\alpha$ -amylase actuellement mise en oeuvre : ainsi la transformation de l'amidon en un sirop de glucose pourrait être réalisée dans une seule étape.

Ce but, ainsi que d'autres qui apparaîtront par la suite, est atteint par une  $\alpha$ -glucosidase qui est caractérisée, selon la présente invention, par le fait qu'elle est obtenue par culture de la souche *Thermococcus hydrothermalis*, souche CNCM I 1319.

Comme énoncé ci-dessus, la présente invention est également relative à une pullulanase qui est caractérisée par le fait qu'elle est produite simultanément avec l' $\alpha$ -glucosidase ci-dessus.

Un exemplaire de la souche du genre *Thermococcus hydrothermalis* a été déposé le 16 juin 1993 à la Collection Nationale des Cultures de Micro-organismes sous le numéro CNCM I 1319 : elle correspond à la souche référencée AL 662 dans la collection détenue par l'IFREMER.

Les deux enzymes issues de *Thermococcus hydrothermalis* peuvent être utilisées simultanément avec une  $\alpha$ -amylase commerciale pour produire un sirop de sucre à partir d'amidon.

La présente invention est décrite en référence aux figures annexées, parmi lesquelles :

- la figure 1 montre l'influence de la température sur l'activité d'une  $\alpha$ -glucosidase selon la présente invention à pH 5,5 ;

- la figure 2 montre l'influence du pH sur l'activité d'une  $\alpha$ -glucosidase selon la présente invention à une température de 80°C ;
- la figure 3 montre l'effet du pH sur l'activité d'une pullulanase purifiée selon l'invention ;
- 5 - la figure 4 montre l'effet de la température sur l'activité d'une pullulanase purifiée selon l'invention ainsi que l'effet protecteur du calcium à une concentration de 1 mM ; et,
- la figure 5 montre l'influence du pH sur l'activité d'une  $\alpha$ -glucosidase selon l'invention et d'une autre produite par une autre souche de *Thermococcus*.

10 Selon la présente invention, une  $\alpha$ -glucosidase est obtenue à partir d'une souche du genre *Thermococcus*, en particulier, *Thermococcus hydrothermalis*, et une pullulanase à partir d'une souche du genre *Thermococcus*, notamment *Thermococcus hydrothermalis*.

15 Une souche de *Thermococcus hydrothermalis* a été rendue public sous le numéro CNCM I 1319 : elle a été déposée le 16 juin 1993.

L' $\alpha$ -glucosidase est une enzyme constitutive chez *Thermococcus hydrothermalis*. La mise au point de la production de cette enzyme chez cette bactérie a montré que certaines sources carbonées (comme l'amidon soluble, le glycogène et des dextrines) pouvaient induire par trois la production de l'enzyme. L'ajout de 4 g/l d'amidon soluble au milieu d'induction a été retenu pour la suite de l'étude.

20 Le rapport entre la croissance de la souche et la production enzymatique a été abordé. Ainsi, *Thermococcus hydrothermalis*, cultivé en fermenteur d'un litre et demi sur milieu BHI+soufre+amidon soluble, possède un temps de génération de 34 min. et atteint sa phase stationnaire en 8 heures environ. Le maximum d'activité est atteint en 6-7 heures au niveau du milieu intracellulaire, puis on constate que l'activité intracellulaire diminue progressivement. L'activité extracellulaire qui est faible dans les premières heures de culture, augmente progressivement jusqu'à 24 heures. Ce phénomène peut être expliqué par la lyse cellulaire de la souche : en effet, l' $\alpha$ -glucosidase qui est assurément une enzyme intracellulaire, est libérée dans le milieu de culture lors de la phase stationnaire et la phase de déclin, provoquant cette augmentation d'activité extracellulaire.

25 L'étude des propriétés physico-chimiques de l' $\alpha$ -glucosidase, dans le milieu intracellulaire a montré que cette enzyme est active de façon optimale à pH 5,0-5,5 et à 110°C environ. Elle présente encore 50 % de l'activité maximale entre 96°C et 116°C. A 120°C, l'enzyme est dénaturée. L' $\alpha$ -glucosidase de la souche

35

selon l'invention est stable pendant 24 h à 80°C, tandis qu'à 96°C, il ne reste que 50 % de l'activité initiale au bout de 2 h 30. La stabilité thermique de l'enzyme est augmentée en présence d'amidon. Plus le pourcentage d'amidon est accru et plus la protection de l'enzyme envers l'inactivation par la chaleur augmente. Ainsi, à 106°C, en présence de 10 % d'amidon, la demi-vie de l'enzyme est de 2 h, alors que sans amidon, la demi-vie n'est que de 8 min.

La purification de l'enzyme a été abordée afin de pouvoir mettre en évidence ces caractéristiques exactes et afin que l'enzyme puisse être comparée aux autres  $\alpha$ -glucosidases déjà décrites. Pour cela, *Thermococcus hydrothermalis* est cultivé en fermenteur de 200 litres sur milieu BHI+soufre+amidon, en anaérobiose, à 80°C et pH 6,0. Au bout de 6 heures de croissance, les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation du milieu de culture et cassées par passage sur presse de French. Le milieu intracellulaire contenant l' $\alpha$ -glucosidase est dialysé avec une cellule d'ultrafiltration dont le seuil de coupure est de 30 kDa et concentré par précipitation des protéines au sulfate d'ammonium (70 % de saturation). Après centrifugation, le culot protéique est repris dans un faible volume de tampon et dialysé afin d'éliminer le sulfate d'ammonium. L'échantillon protéique est déposé en plusieurs fois sur une colonne échangeuse d'ions (Hitrap Q sépharose High Performance). Les protéines sont éluées grâce à un gradient discontinu de tampon Tris-HCL contenant 1M de NaCl. Les fractions possédant l'activité  $\alpha$ -pNPGase sont regroupées et concentrées sur cellule UF. La 3ème étape de purification emploie une chromatographie d'affinité sur gel de sépharose sur lequel sont greffés des résidus glucose. L'enzyme est éluée de la colonne grâce à un gradient continu de tampon phosphate contenant 1M de NaCl. La dernière étape consiste à faire passer l'échantillon protéique sur une colonne de tamisage moléculaire (Séphacryl S200 High performance). L'enzyme purifiée est obtenue après toutes ces étapes. La protéine est monomérique et possède une masse molaire d'environ 118000 daltons.

Pour la mise en évidence de la production d'une pullulanase, on a utilisé un milieu de culture, appelé BHIS, composé d'infusion de coeur-cervelle (9 g/l), de NaCl (23 g/l), de soufre élémentaire (5 g/l), de tampon PIPES (6,05 g/l), de résazurine (1 mg/l). Après tyndallisation (40 min à 100°C deux jours successivement), le milieu est réduit par du  $\text{Na}_2\text{S}$  (0,5 g/l) dans une enceinte anaérobie où la composition en gaz est  $\text{N}_2/\text{H}_2/\text{CO}_2$  dans les proportions 90 % / 5 % / 5 %. L'incubation est réalisée à 80°C.

Après croissance, les milieux sont dégazés à l'azote pour éliminer l'H<sub>2</sub>S formé par l'isolat, filtrés pour retenir le soufre élémentaire, puis cellules et surnageants sont séparés par centrifugation (10.000 g pendant 40 min).

5 L'activité pullulanase est déterminée en mesurant les sucres réducteurs libérés, par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (Miller 1959), quand l'extrait enzymatique est incubé à 80°C en présence de pullulanase (0,75 %) dans du tampon phosphate de sodium (200 mM, pH 6.0).

Pour l'étude du pH, les conditions sont identiques à celles citées précédemment avec un tampon citrate-phosphate 200 mM pour les pH 3.0-7.0 et un  
10 tampon phosphate de sodium 200 mM pour les pH 6.0-8.0.

Pour l'étude de l'induction de l'activité pullulanase par les sucres, une autre technique a été utilisée. Il s'agit de suivre l'hydrolyse du pullulane coloré (bleu brillant de rémazol-pullulane) par la libération du groupement coloré (bleu brillant de rémazol).

15 La purification de l'enzyme a été abordée afin de pouvoir mettre en évidence ces caractéristiques exactes et afin que l'enzyme puisse être comparée aux autres pullulanases déjà décrites. Pour cela *Thermococcus Hydrothermalis* a été cultivé dans les conditions précédemment décrites, avec les différences suivantes : le maltose est utilisé à la place de l'amidon et la culture dure 23 heures les autres  
20 conditions sont inchangées.

Les protéines précipitées au sulfate d'ammonium ont été remises en solution dans du tampon phosphate de sodium pH 6,0 et déposées sur une colonne de chromatographie d'interactions hydrophobes. L'élution a été réalisée avec un gradient décroissant de sulfate d'ammonium (de 1 à 0 molaire) dans du tampon  
25 phosphate de sodium pH 6,0. Après cette première étape, le rendement de récupération de l'activité pullulanase a été de 31 % et le taux de purification de 10.

On a ensuite réalisé une chromatographie par échange d'ions à pH 8,5 après une concentration et une diafiltration des fractions contenant l'activité pullulanase. Les protéines ont été éluées avec un gradient de chlorure de sodium (de 0  
30 à 1 molaire) dans du tampon Tris-HCl pH 8,5. Par rapport à l'extrait brut de départ, le rendement de récupération était de 15 % et le taux de purification de 30.

La dernière étape a été une chromatographie d'affinité après concentration et diafiltration des fractions récupérées précédemment. Le maltotriose a été utilisé comme ligand d'affinité, et a été couplé à du sépharose activé. L'enzyme a  
35 été éluée avec un gradient de chlorure de sodium (de 0 à 0,6 molaire) dans du

tampon acétate de sodium pH 5,5. Le rendement de récupération de cette dernière étape était de 8 % et le taux de purification de 97 par rapport à l'extrait brut.

L'enzyme purifiée est obtenue après toutes ces étapes et possède une masse molaire d'environ 128000 daltons.

5 Les propriétés de l'enzyme purifiée sont illustrées sur les figures 3 et 4.

Les enzymes, selon la présente invention, sont d'une grande utilité notamment dans l'amidonnerie : la conversion de l'amidon en divers sirops de sucre se déroule à hautes températures du fait de la très faible solubilité de l'amidon.

10 L'utilisation d'une  $\alpha$ -glucosidase compatible avec l' $\alpha$ -amylase mise en oeuvre lors du premier stade de transformation permet de réduire le procédé de transformation en une seule étape. De même, l'utilisation d'une pullulanase qui présente une activité maximale dans cette même zone de température, permet de concourir à la conversion de l'amidon en divers sirops de sucre en une seule et même étape.

15 L'utilisation de ces enzymes est illustrée par les deux exemples suivants :

**Exemple 1 :**

20 Action d'un extrait brut de la souche *Thermococcus Hydrothermalis* riche en  $\alpha$ -glucosidase.

2 essais sont réalisés en parallèle avec de l'amidon de blé natif comme substrat

25	<b>essai 1 :</b>	Amidon natif	90 g
		CaCl <sub>2</sub>	60ppm
		Termamyl 120I	150 micro-litres

tampon phosphate pH 6,0 200 mM en quantité suffisante pour avoir un volume réactionnel de 300 ml.

30 **essai 2** identique à l'essai 1 mais avec 30 unité  $\alpha$ -glucosidase issue de *Thermococcus hydrothermalis*

Pour les deux essais, la température d'incubation est de 90°C.

35

Les résultats sont présentés dans le tableau I suivant :

Tableau I

Temps (heures)	Essai 1 Glucose g/l	Essai 1 DE g/l	Essai 2 Glucose g/l	Essai 2 DE g/l
0	0	6	0	6
1	3,6	14,7	7,7	17,4
3	6,5	16,8	14,4	22
7	7,5	18,75	26	29

Les essais n'ont pas été poursuivis au delà de 7 heures, car comme nous avons utilisé un extrait brut comme source d'enzyme, très riche en protéine, cela a entraîné la formation de composé de Maillard dans le milieu réactionnel rendant difficile l'analyse des produits de la réaction.

Mais, cet exemple préliminaire montre qu'il est possible de réaliser en une seule étape la réaction de liquéfaction et la réaction de saccharification.

### Exemple 2

Action d'un extrait brut de la souche *Thermococcus hydrothermalis* riche en pullulanase

2 essais sont réalisés en parallèle avec de l'amidon de blé natif comme substrat

**essai 1 : Liquéfaction**

Amidon 160 g/l

Termamyl 120 I 150 micro-litre

CaCl<sub>2</sub> 60 ppm

tampon phosphate pH 6,2 200 mM en quantité suffisante pour avoir un volume réactionnel de 300 ml.

Incubation 2 heures à 90°C.

**Saccharification**

ajout de 55 Unité amyloglucosidase AMG 300 L commercialisée par la société Novo Nordisk.

La réaction est suivie pendant 22 heures à 60°C.

## essai 2

identique à l'essai 1 mais durant l'étape de liquéfaction, diverses quantités de pullulanase de *Thermococcus hydrothermalis* ont été ajoutées soit : 34 Unités, 68 Unités, 136 Unités.

5 Les résultats sont présentés sur la figure 6 ci-jointe.

Ils nous montrent clairement que l'ajout de la pullulanase thermostable lors de l'étape de liquéfaction permet de réduire significativement le temps de saccharification.

10 Comme une autre souche de *Thermococcus* dite *Thermococcus AN1* est connue comme pouvant produire des enzymes de même fonction que la souche *Thermococcus hydrothermalis*, on a comparé l'activité de ces deux  $\alpha$ -glucosidase.

Ainsi, la figure 5 représente l'activité des deux enzymes en fonction du pH : on notera que le maximum d'activité est différent, de même que la forme de la courbe. L'activité maximale d'une  $\alpha$ -glucosidase selon l'invention est comprise entre 15 5,5 et 7,5 et est au delà de 7 pour celle issue de *Thermococcus NA1* actuellement dénommée *Thermococcus zilligii*.

Dans le tableau II ci-après, on a regroupé le taux d'activité résiduelle de ces deux  $\alpha$ -glucosidases lors d'incubation avec effecteurs à température ambiante pendant 1 heure.

20

Tableau II

Effecteurs	Activité résiduelle (%)	
	T. Hydrothermalis	T. AN1
Tampon phosphate pH 7,4		100
Tampon phosphate pH 6,0	100	
urée 4 M	85	73
SDS 2 %	165	116
SDS 1 %	170	121
DTT 1 %	106	170
BSA 4 %	174	250

SDS : sodium dodécylsulfate

DTT : dithiothréitol

BSA : bovine séro-albumine

De ces essais comparatifs, il apparaît que l'  $\alpha$ -glucosidase produite par *Thermococcus hydrothermalis* présente des propriétés propres.

## REVENDICATIONS

1.  $\alpha$ -glucosidase caractérisée par le fait qu'elle est obtenue par culture  
5 de la souche *Thermococcus hydrothermalis*.

2.  $\alpha$ -glucosidase, selon la revendication 1, caractérisée par le fait que la souche la produisant est *Thermococcus hydrothermalis*, CNCM I 1319.

10 3.  $\alpha$ -glucosidase, selon la revendication 1 ou 2, caractérisée par le fait que :

a) elle présente une activité maximale à un pH compris entre 5,0-5,6 à une température de 96 et 116°C, le substrat étant de l'amidon

15 b) elle présente une activité inventive maximale à une température de 110°C à un pH de 5,5, le substrat étant de l'amidon.

4. Pullulanase, caractérisée par le fait qu'elle est obtenue par culture de la souche *Thermococcus hydrothermalis*.

20 5. Pullulanase, selon la revendication 4, caractérisée par le fait que la souche la produisant est *Thermococcus hydrothermalis*, CNCM I 1319.

6. Pullulanase, selon la revendication 4 ou 5, caractérisée par le fait que :

25 a) elle présente une activité maximale à un pH compris entre 5,0-6,2 pour une température de 85 à 115°C, le substrat étant l'amidon ou le pullulane

b) elle présente une activité maximale à une température de 110°C à un pH de 5,5, le substrat étant le pullulane ou l'amidon.

30 7. Procédé pour produire un sirop de sucre à partir d'amidon, caractérisé par le fait que l'on utilise simultanément une  $\alpha$ -amylase commerciale, une  $\alpha$ -glucosidase et une pullulanase issues de *Thermococcus hydrothermalis*.

35

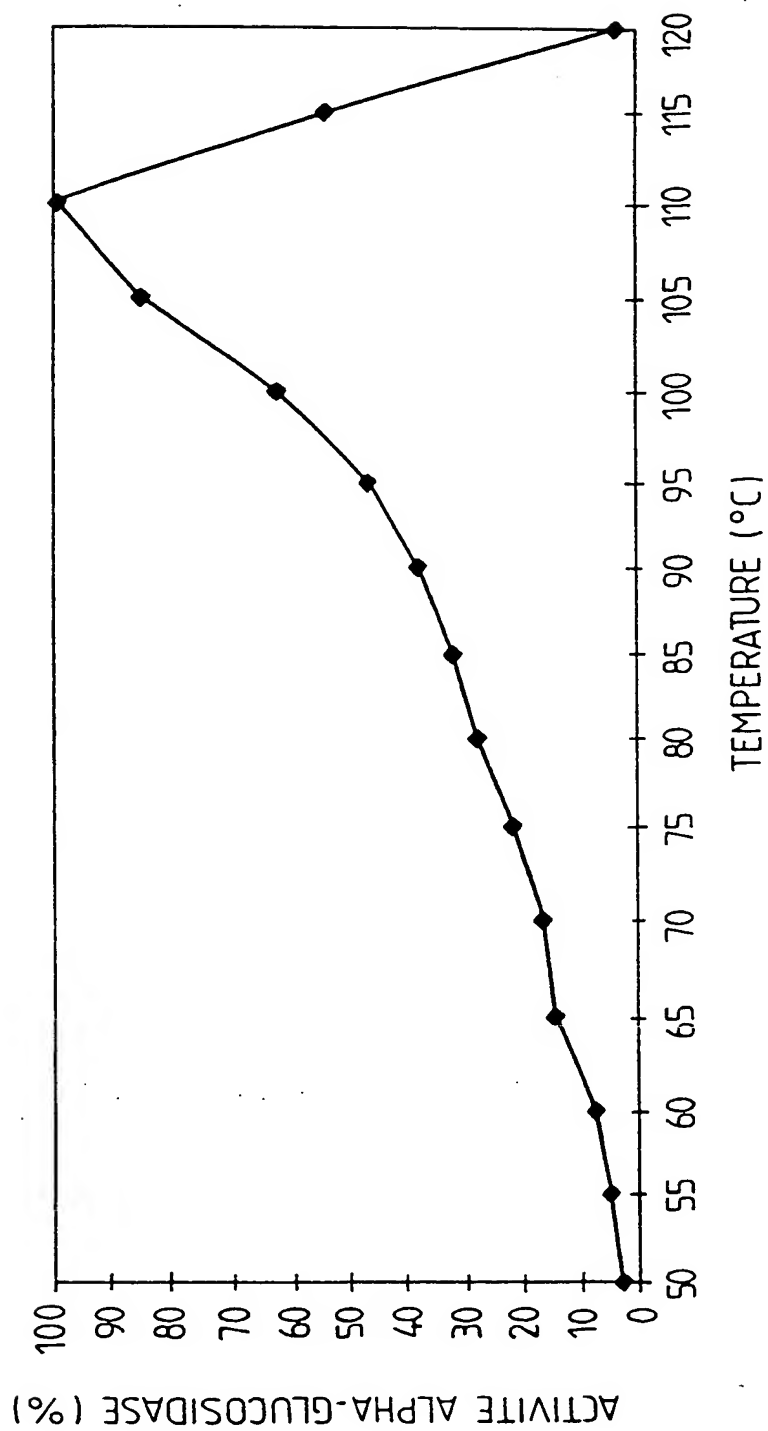


FIG.1

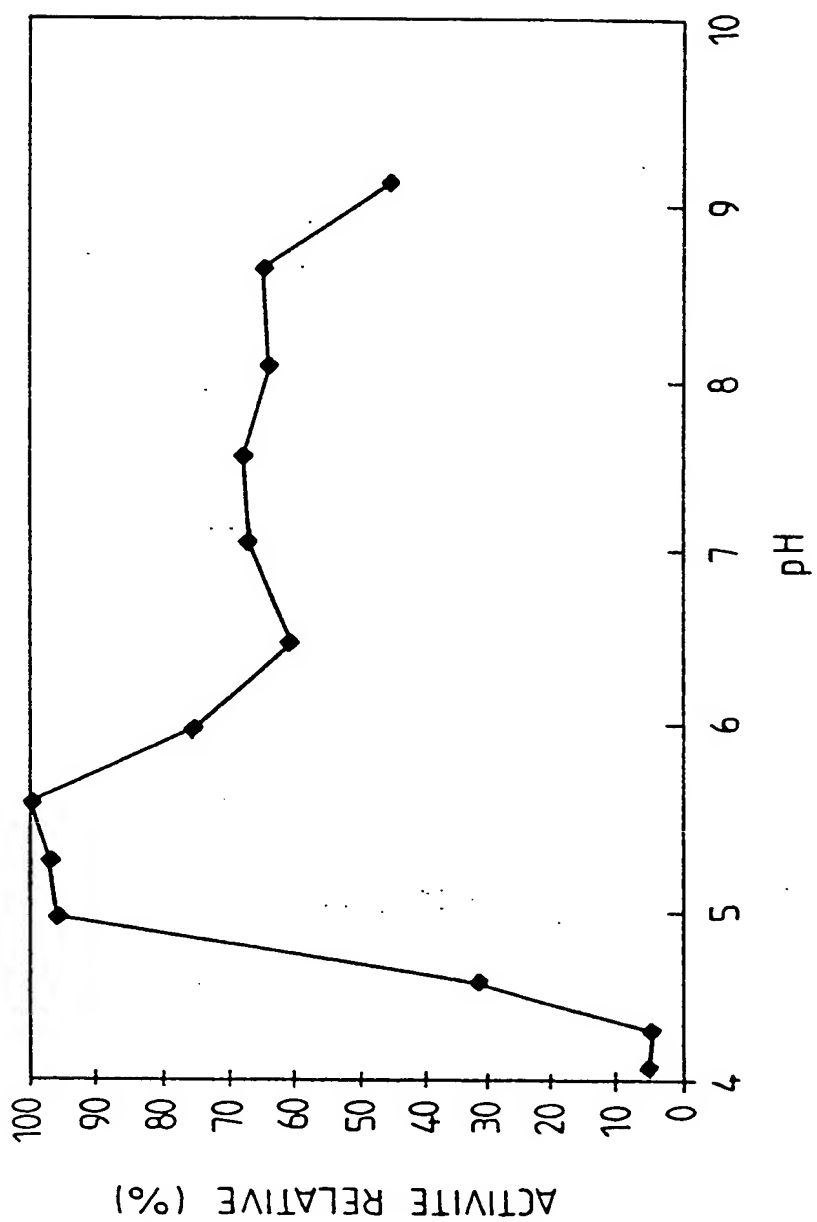


FIG.2

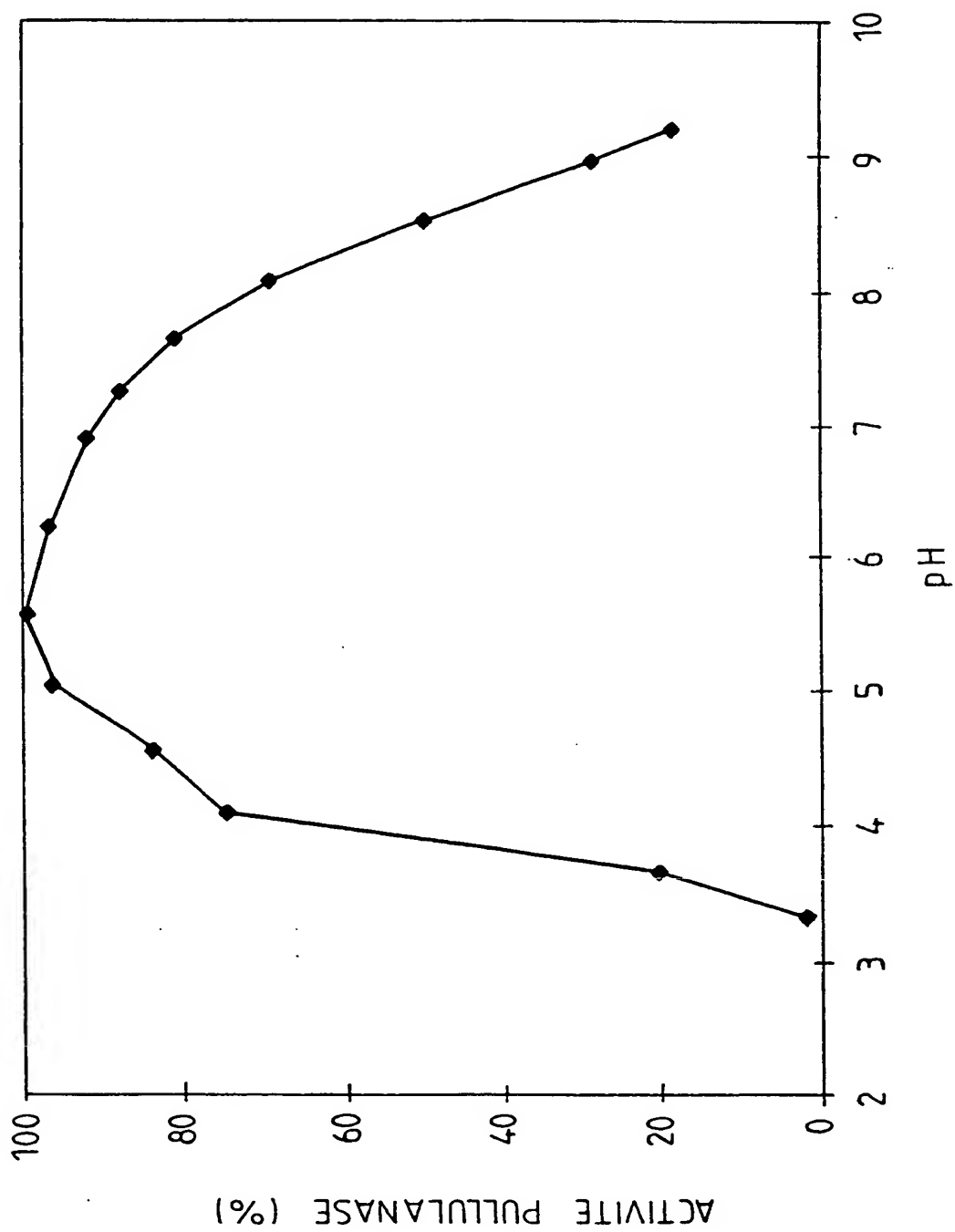


FIG. 3

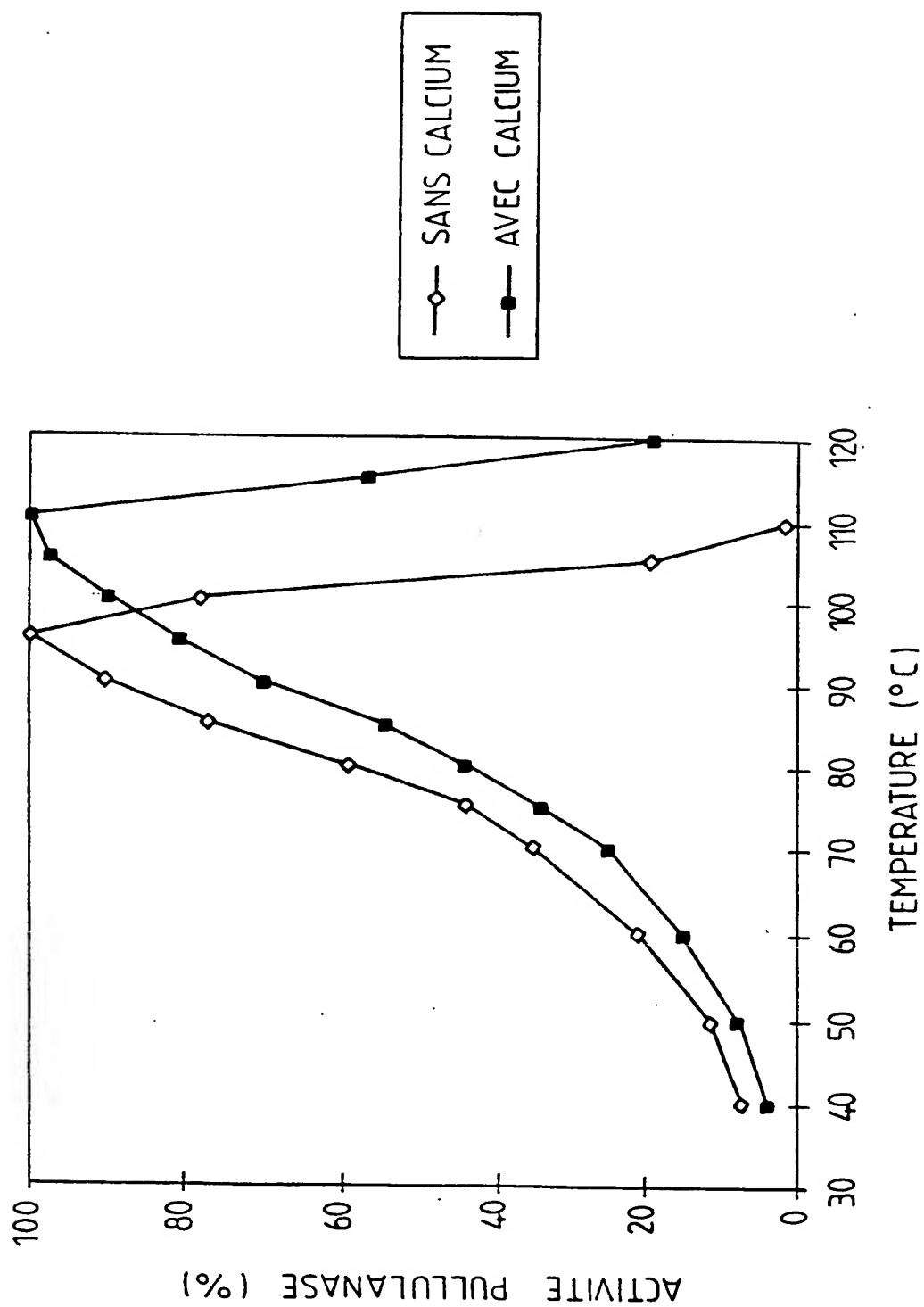


FIG.4

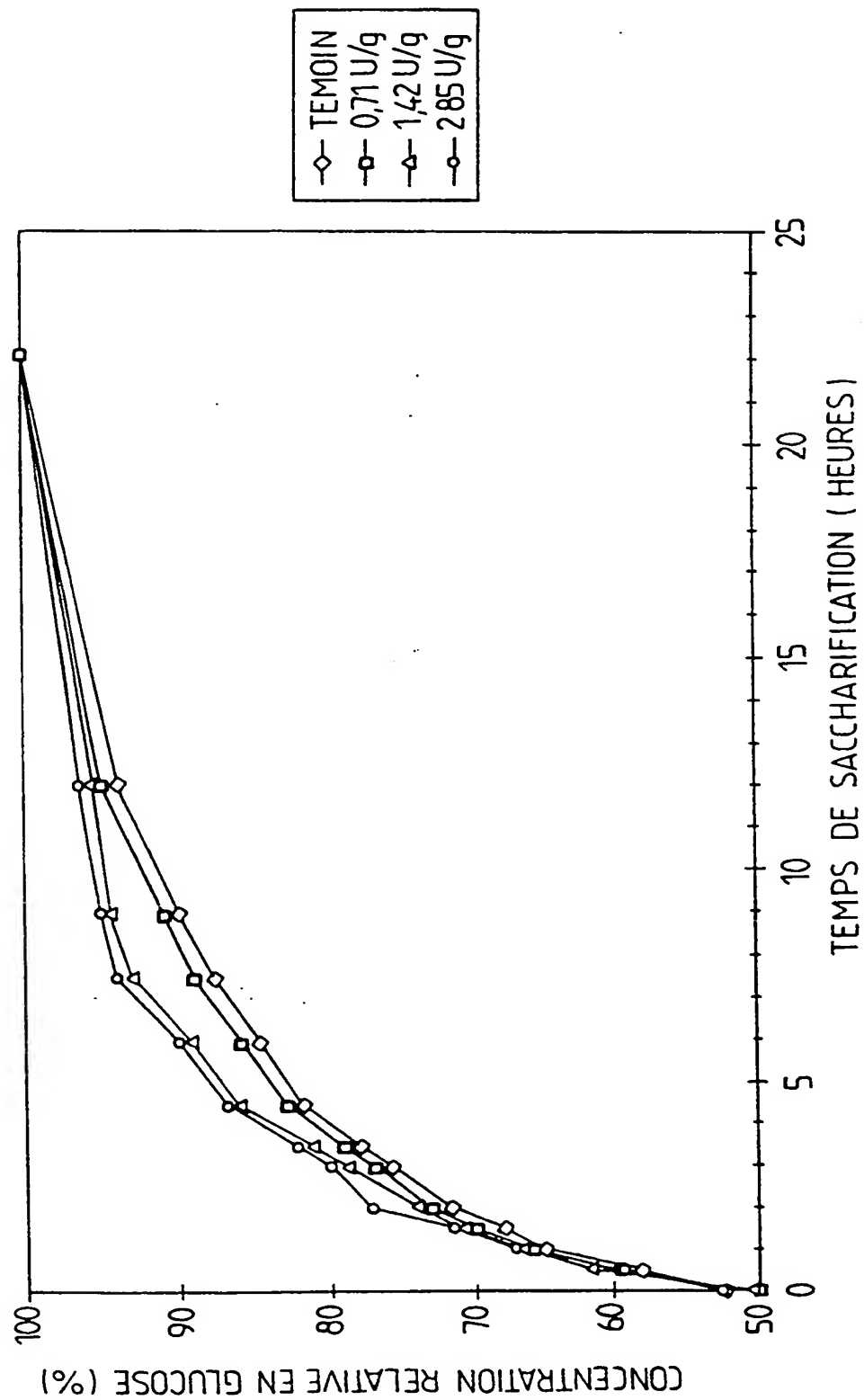


FIG.5

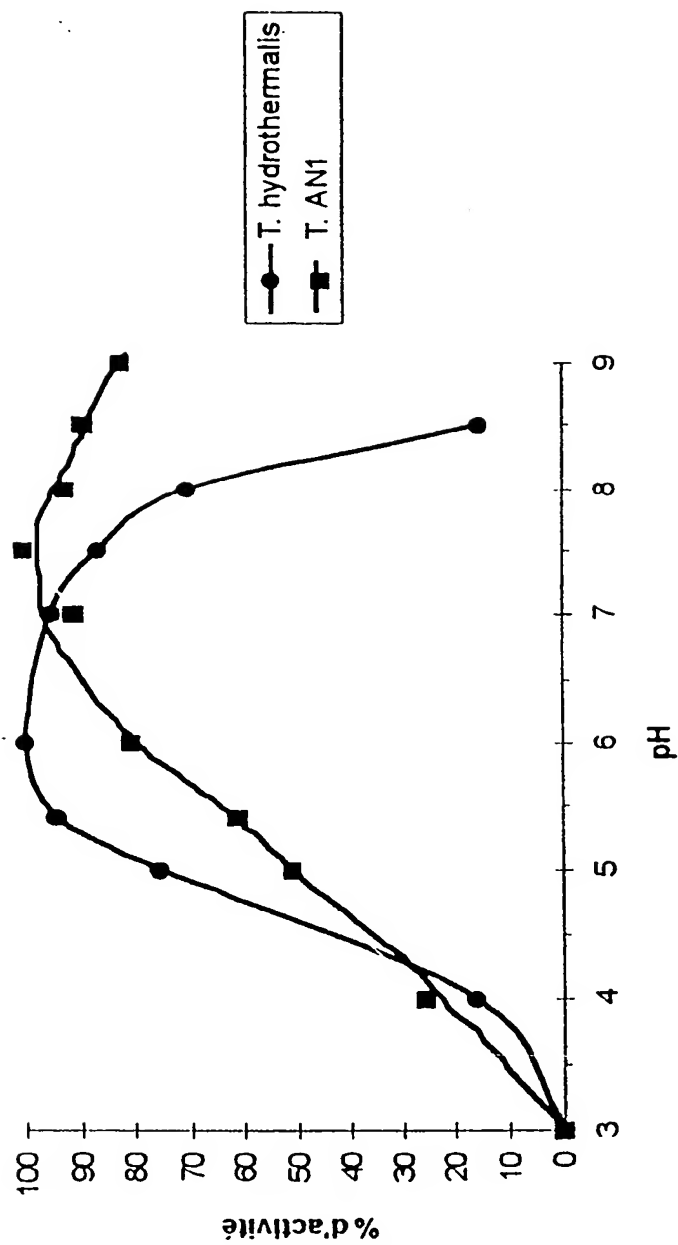


FIG. 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/FR 97/02271

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C12N9/34 C12N9/44 //(C12N9/34,C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE PASCAL INIST, CNRS (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE), VANDOEUVRE-LES-NANCY, FR Thesis, December 1996 GANTELET H ET AL: "Mise en evidence, purification et caractérisation des propriétés d'une pullulanase thermostable issue d'une archaebacterie thermophile extrême de l'ordre des Thermococcales isolée des écosystèmes hydrothermeaux océaniques abyssaux" XP002048334 see abstract --- -/--	4-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 1998

Date of mailing of the international search report

29.04.98

Name and mailing address of the ISA  
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02271

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PILLER K ET AL.: "PROPERTIES AND STABILIZATION OF AN EXTRACELLULAR ALPHA-GLUCOSIDASE FROM THE EXTREMELY THERMOPHILIC ARCHAE BACTERIA THERMOCOCCUS STRAIN AN1: ENZYME ACTIVITY AT 130 DEGREE C"</p> <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1292, no. 1, 1996, AMSTRDAM NL, pages 197-205, XP002040764 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,7
A	<p>BROWN S H ET AL: "CHARACTERIZATION OF AMYLOLYTIC ENZYMES, HAVING BOTH ALPHA-1,4 AND ALPHA-1,6 HYDROLYTIC ACTIVITY, FROM THE THERMOPHILIC ARCHAEA PYROCOCCUS FURIOSUS AND THERMOCOCCUS LITORALIS" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 59, no. 8, August 1993, WASHINGTON US, pages 2614-2621, XP000604490 see page 2614 - page 2617</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
A	<p>FR 2 706 906 A (IFREMER) 30 December 1994 see page 4, line 4 - page 5, line 10</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,4,5
A	<p>ANTRANIKIAN G: "THE BIOTECHNOLOGICAL SIGNIFICANCE OF EXTREME THERMOPHILIC MICROORGANISMS AND THEIR EXTRACELLULAR ENZYMES" DECHEMA BIOTECHNOLOGY CONFERENCES, vol. 5, 1992, STUTTGART DE, pages 13-16, XP002048333</p> <p style="text-align: center;">---</p>	4-6
A	<p>WO 95 23852 A (NOVONORDISK AS) 8 September 1995 cited in the application see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	4-7
T	<p>GODFROY A ET AL.: "THERMOCOCCUS HYDROTHERMALIS SP. NOV., A NEW HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEON ISOLATED FROM A DEEP-SEA HYDROTHERMAL VENT" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 47, no. 3, 1997, WASHINGTON US, pages 622-626, XP002040766 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02271

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2706906 A	30-12-94	NONE	
WO 9523852 A	08-09-95	AU 1756195 A	18-09-95
		EP 0793716 A	10-09-97

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/02271

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N9/34 C12N9/44 //(C12N9/34,C12R1:01)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE PASCAL INIST, CNRS (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE), VANDOEUVRE-LES-NANCY, FR Thesis, décembre 1996 GANTELET H ET AL: "Mise en évidence, purification et caractérisation des propriétés d'une pullulanase thermostable issue d'une archaebactérie thermophile extrême de l'ordre des Thermococcales isolée des écosystèmes hydrothermaux océaniques abyssaux" XP002048334 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	4-6

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
14 avril 1998	29.04.98
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  De Kok, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. : Internationale No

PCT/FR 97/02271

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PILLER K ET AL.: "PROPERTIES AND STABILIZATION OF AN EXTRACELLULAR ALPHA-GLUCOSIDASE FROM THE EXTREMELY THERMOPHILIC ARCHAE BACTERIA THERMOCOCCUS STRAIN AN1: ENZYME ACTIVITY AT 130 DEGREE C"</p> <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1292, no. 1, 1996, AMSTRDAM NL, pages 197-205, XP002040764 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-3,7
A	<p>BROWN S H ET AL: "CHARACTERIZATION OF AMYLOLYTIC ENZYMES, HAVING BOTH ALPHA-1,4 AND ALPHA-1,6 HYDROLYTIC ACTIVITY, FROM THE THERMOPHILIC ARCHAEA PYROCOCCUS FURIOSUS AND THERMOCOCCUS LITORALIS" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 59, no. 8, août 1993, WASHINGTON US, pages 2614-2621, XP000604490 voir page 2614 - page 2617</p> <p>---</p>	1
A	<p>FR 2 706 906 A (IFREMER) 30 décembre 1994 voir page 4, ligne 4 - page 5, ligne 10</p> <p>---</p>	2,4,5
A	<p>ANTRANIKIAN G: "THE BIOTECHNOLOGICAL SIGNIFICANCE OF EXTREME THERMOPHILIC MICROORGANISMS AND THEIR EXTRACELLULAR ENZYMES" DEHEMA BIOTECHNOLOGY CONFERENCES, vol. 5, 1992, STUTTGART DE, pages 13-16, XP002048333</p> <p>---</p>	4-6
A	<p>WO 95 23852 A (NOVONORDISK AS) 8 septembre 1995 cité dans la demande voir abrégé</p> <p>---</p>	4-7
T	<p>GODFROY A ET AL.: "THERMOCOCCUS HYDROTHERMALIS SP. NOV., A NEW HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEON ISOLATED FROM A DEEP-SEA HYDROTHERMAL VENT" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 47, no. 3, 1997, WASHINGTON US, pages 622-626, XP002040766 voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1-7

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema Internationale No

PCT/FR 97/02271

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2706906 A	30-12-94	AUCUN	
WO 9523852 A	08-09-95	AU 1756195 A	18-09-95
		EP 0793716 A	10-09-97

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)